

**Other Formats:****Links:**

LOCUS E03345 1007 bp DNA PAT 26-NOV-1996  
 DEFINITION DNA sequence coding for unchangeable region of dog immunoglobulin gamma chain.  
 ACCESSION E03345  
 NID g2171562  
 KEYWORDS JP 1992040894-A/1.  
 SOURCE Canis sp..  
 ORGANISM Canis sp.  
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Chordata;  
 Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Carnivora; Fissipedia; Canidae;  
 Canis.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1007)  
 AUTHORS Kazuhiko,K., Yasuyuki,E., Hiroaki,M., Yoichi,O. and Yukio,T. .  
 TITLE GENE FRAGMENT TO CODE CONSTANT REGION OF DOG IMMUNOGLOBULIN CHAIN  
 AND MOUSE X DOG CHIMERA ANTIBODY  
 JOURNAL Patent: JP 1992040894-A 1 12-FEB-1992;  
 CHEMO SERO THERAPEUT RES INST  
 COMMENT OS Canis sp. (dog)  
 PN JP 1992040894-A/1  
 PD 12-FEB-1992  
 PF 07-JUN-1990 JP 1990150673  
 PI KURUMI KAZUHIKO, EDA YASUYUKI, MAEDA HIROAKI, ONO YOICHI, PI  
 TOKIYOSHI YUKIO  
 PC C12N15/13,C07K13/00,C12N15/62,C12P21/08//A61K39/395,  
 G01N33/531, PC G01N33/577;  
 CC strandedness: Double;  
 CC topology: Linear;  
 CC hypothetical: No;  
 CC anti-sense: No;  
 CC \*source: tissue\_type=Liver;  
 FH Key Location/Qualifiers  
 FH  
 FT CDS 1..<1007  
 /product='Unchangeable region of dog' FT  
 immunoglobulin gamma  
 chain'.  
 FT Location/Qualifiers  
 FEATURES source 1..1007  
 /organism="Canis sp."  
 /db\_xref="taxon:9616"  
 BASE COUNT 230 a 326 c 264 g 187 t  
 ORIGIN  
 1 cctccaccac ggccccctcg gtttcccac tggacccag ctgcgggtcc acttccggct  
 61 ccacggtgcc cctggcctgc ctggtgtca gctacttccc cgagcctgta actgtgtcct  
 121 ggaattccgg ctccttgacc agcggtgtgc acaccttccc gtccgacctg cagtcctcag  
 181 ggctctactc cctcagcagc atggtgacag tgccctccag caggtggtcc agcgagacct  
 241 tcacctgcaa cgtggcccac cccggccagca aaactaaagt agacaaggcca gtgcccaaaa  
 301 gagaaaaatgg aagagttcct cggccacacgt attgtccaa atgcccagcc cctgaaatgc  
 361 tgggaggggcc ttccggtcttc atctttccccc cgaaacccaa ggacacccctc ttgattgccc  
 421 gaacacctga ggtcacatgt gtgggtggat atctgggacc agaagaccct gaggtgcaga  
 481 tcagctggtt cgtggacggc aagcagatgc aaacagccaa gactcagcct cgtgaggagc  
 541 agttcaatgg cacctaccgt gtggtcagtg tcctccccat tgggcaccag gactggctca  
 601 aggggaagca gttcacgtgc aaagtcaaca acaaagccct cccatccccg atcgagagga  
 661 ccatctccaa ggccagaggg caggcccatc agcccagtgt gtatgtccct cggccatccc  
 721 gggaggagtt gagcaagaac acagtcagct tgacatgcct gatcaaagac ttcttccac  
 781 ctgacattga tgtggagtgg cagagcaatg gacagcagga gcctgagagc aagtaccgca  
 841 cgaccccgcc ccagctggac gaggacgggt cctacttcct gtacagcaag ctctctgtgg  
 901 acaagagccg ctggcagcgg ggagacaccc tcatatgtgc ggtgatgcat gaagctctac

BEST COPY

COPY

④日本国特許庁(JP)

⑤特許出願公開

⑥公開特許公報(A) 平4-40894

⑦Int.Cl.

C 12 N 15/13  
C 07 K 13/00

識別記号

ZNA

序内整理番号

7731-4H  
8717-4B

⑧公開 平成4年(1992)2月12日

C 12 N 15/00 A※  
審査請求 未請求 請求項の数 8 (全11頁)

⑨発明の名称 イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびマウス×イヌキメラ抗体

⑩特願 平2-150673

⑪出願 平2(1990)6月7日

⑫発明者 来 海 和 彦 熊本県熊本市京町本丁4-60

⑬発明者 江 田 康 幸 熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88

⑭発明者 前 田 浩 明 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142 公園4-609

⑮発明者 小 野 洋 一 熊本県熊本市清水町山室295-2 新規アパート101号

⑯発明者 時 吉 幸 男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19

⑰出願人 財団法人化学会及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大庭668番地

⑱代理人 弁理士 简 井 知

最終頁に続く

### 明細書

#### 1. 発明の名称

イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびマウス×イヌキメラ抗体

#### 2. 特許請求の範囲

(1) イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域ポリペプチドをコードするDNA配列を有する遺伝子断片。

(2) 该定常領域ポリペプチドのCB3FメインのC末端側から最初のシスティンの近傍のアミノ酸配列が下記のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ile-Cys-Ala-

(3) 该定常領域ポリペプチドのCB3FメインのN末端側から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記の配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

(4) 该定常領域ポリペプチドのCB3FメインのN末端側から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記の配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-Pro-Ser-

(5) 该定常領域ポリペプチドが下記のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ser-Thr-Thr-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Asp  
-Pro-Ser-Cys-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Ser-Thr-Val  
-Ala-Leu-Ala-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Phe-Pro  
-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ser  
-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ser-Asp  
-Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser  
-Met-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Arg-Trp-Ser-Ser  
-Gly-Thr-Phe-Thr-Cys-Asn-Val-Ala-His-Pro-Ala  
-Ser-Lys-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Pro-Val-Pro-Lys  
-Arg-Glu-Asn-Gly-Arg-Val-Pro-Arg-Pro-Pro-Asp  
-Cys-Pro-Lys-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Met-Leu-Gly  
-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro  
-Lys-Asp-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Gly  
-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Leu-Gly-Pro-Gly  
-Asp-Pro-Gly-Val-Gly-Ile-Ser-Trp-Phe-Val-Asp  
-Gly-Lys-Gln-Met-Gly-Thr-Ala-Lys-Thr-Gly-Pro  
-Arg-Glu-Gly-Gly-Phe-Asn-Gly-Thr-Tyr-Arg-Val

-Val-Ser-Val-Lys-Pro-Ile-Gly-His-Gln-Asp-Trp  
 -Leu-Lys-Gly-Lys-Gln-Phe-Thr-Cys-Lys-Val-Asn  
 -Asn-Lys-Ala-Lys-Pro-Ser-Pro-Ile-Glu-Arg-Thr  
 -Ile-Ser-Lys-Ala-Arg-Gly-Gln-Ala-His-Gln-Pro  
 -Ser-Val-Tyr-Val-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Gly-Gln  
 -Leu-Ser-Lys-Asn-Thr-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu  
 -Ile-Lys-Asp-Phe-Phe-Pro-Pro-Asp-Ile-Asp-Val  
 -Glu-Trp-Gln-Ser-Asn-Gly-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln  
 -Ser-Lys-Tyr-Arg-Thr-Thr-Pro-Pro-Gln-Leu-Asp  
 -Glu-Asp-Gly-Ser-Tyr-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu  
 -Ser-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Arg-Gly-Asp  
 -Thr-Phe-Ile-Cys-Ala-Val-His-His-Gln-Ala-Leu  
 -His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-His  
 -Ser-Pro-Gly-Lys

(6) 記載第(1)項から第(6)項のいずれかに記載のイヌ免疫グロブリンの定常領域をコードする遺伝子断片をマウス免疫グロブリンH鎖の可変領域をコードする遺伝子断片の3'端に接続したことを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖をコードする組換えDNA分子。

(7) 記載第(6)項記載の組換えDNA分子を発現ベクターに組み込み、この組換えベクターによって酵母經由された抗原を増殖し、発現されたマウス×イヌキメラ抗体H鎖を回収することを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製法。

(8) 記載第(7)項記載のマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製法により得られるマウス×イヌキメラ抗体。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、イヌの疾病、特に伝染病の診断、治療及び予防に用件できる有用なイヌモノクローナル抗体に関する。さらに詳細にはイヌモノクローナル抗体を形成するイヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびこれを利用したマウス×イヌキメラ抗体に関する。

#### 発明の意義

イヌはペットとして昔から人間に愛着のある動物であるが、近年の歴史では、「伴侶、仲間、精神としての動物」(Companion species)と称され、人間社会の一員としての地位を獲得しつつある。

もう一方では、医学、薬学、畜医学から心理学にいたる実験動物としての貴重度は東から大きなものであったが、近年では医薬品の効能検定や安全性試験にSPFイヌなどの呼称のもとで更に貴重度が高まっている。いずれの場合にも当然のこととして、これらのイヌの疾病、特に伝染病に関するより確実な知識がますます必要となり、その診断、治療、予防のための方法が確立される事が要求されている。

イヌのウイルス性疾患は多く、なかでもイヌジストンバーウィルス、イヌバルボウイルス、イヌ伝染性肝炎ウイルス等の疾患は急性で致死率が高い。予防としてのワクチンは開発されているものの、感染・発症したイヌの治療法としては、抗生素質、サルファ剤等の二次細胞感染予防の対応療法しかないと。現在の治療法には問題を残している。従来より治療法として高免疫血清や血清由來の免疫グロブリンが使用され有効な実績を残してきた。しかし、現在では、動物愛護思想の高まりと共に、イヌ血清蛋白の入手が困難になり

この治療法は使いたくとも使用できない状況になっている。反って、従来の高免疫血清に代わって感染ウイルスを中和できるモノクローナル抗体が出来れば、これらウイルス性疾患の治療に大きく貢献することが可能である。

#### 技術的背景

上記のような高免疫血清の代替品として、ウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作用に関する基本的な技術は、これまでに主としてマウス型モノクローナル抗体において確立されている。ハイブリドーマ等の細胞が產生するモノクローナル抗体は大量にしかし半永久に得られ、原材料不足の問題を解消できる。しかし、ここにおけるモノクローナル抗体は、副作用(マウスモノクローナル抗体をイヌに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血栓病などの副作用を起こすことが考えられる)をなくす意味から、従来のマウスモノクローナル抗体ではなくイヌモノクローナル抗体でなければならない。

これらのイヌウイルス性疾患の治療薬としてのイヌモノクローナル抗体の作製法には次のようなものが考えられる。 (1)イヌ×イヌハイブリドーマを用いる方法、 (2)ある種のウイルス及び化学薬剤等でトランスフォームさせたイヌリンパ球を用いる方法、 (3)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを用いる方法、 (4)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを親株としたイヌ×(イヌ×マウス)ハイブリドーマを用いる方法、 (5)キメラモノクローナル抗体(抗原と結合する可変(V)領域はウイルス中和活性を有するマウスモノクローナル抗体から、 抗原性あるいは免疫原性及び生物学性に固有する定常(C)領域はイヌモノクローナル抗体からなる、 マウス(V)-イヌ(C)キメラモノクローナル抗体)を遺伝子組換えで作製する方法、 等であるが、 これらの方策による成功例は一切報告されていない。

ここで、 (1)については融合効率が低いことや過当なミエローマ細胞がないこと、 (2)についてヒトの場合の即ウイルスに相当する適当なウイルスや過当な化学薬剤がないこと、 さらに、 (3)(4)の

方法ではヒト型モノクローナル抗体作製例から考えて、 目的のイヌ型モノクローナル抗体を高効率に得るまでには多くの困難が予想される(例えば、 実験性の問題等)。 従って、 (5)のキメラモノクローナル抗体法がより実現性の高い方法であると考えられる。

このキメラモノクローナル抗体は、 可変(V)領域の原形となるマウスモノクローナル抗体を產生するマウス×マウスハイブリドーマからクローニングしたそのV遺伝子と、 定常(C)領域となるイヌモノクローナル抗体を產生するイヌ抗体產生細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-イヌ(C)キメラ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターを、 離乳細胞(例えば、 マウスミエローマ)細胞中で発現させ、 その培養上清中に得られるものである。 ヒトにおいてはすでにキメラ抗体に関するいくつかの報告が見受けられる(特開昭60-155132号、 特開昭61-47500号)。

このようにイヌキメラ抗体の作製には、 目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変(V)領域のアミ

ノ酸配列をコードする遺伝子とイヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子が必要となる。 キメラ抗体の可変(V)領域遺伝子は、 前述した様々のイヌウイルス等に対して中和活性を有するマウスモノクローナル抗体を產生する細胞から得られるもので、 この細胞は従来のマウス×マウスハイブリドーマ法で比較的容易に作製することが出来る。 しかしながら、 キメラ抗体の定常領域遺伝子となるイヌ免疫グロブリンC領域遺伝子については現在のところ全くその構造が明らかでおらず、 遺伝子もクローニングされていない。 従って、 イヌキメラ抗体を作製するためには、 イヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっている。

#### 発明の目的

このような状況にあって、 本発明者は、 イヌ免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列をコードしている遺伝子を單離すべく研究を重ねた結果、 これを単離することに成功した。 すなわち、 本発

明は、 これまでに一切報告されていないイヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子を単離するものであり、 これによりイヌキメラ抗体の作製を可能にするものである。 本発明のイヌ免疫グロブリンA鎖をコードする遺伝子を用いて作られたイヌキメラ抗体は、 イヌの疾患、 特に伝染病に対して副作用のない治療薬、 治療薬・予防薬への応用を可能にするものである。

#### 発明の構成及び効果

免疫グロブリンのA鎖としては、 すでにヒト及びマウス(例えば、 A. Shiba et al., Cell, 29, p121 (1982); H. Takabayashi et al., Cell, 29, p671 (1982))で発見され、 さらに、 猫の動物細胞のA鎖では、 ウサギ[C. L. Harries et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, p6018 (1982)], ウシ[E. L. Knight et al., J. Immunol., 140, p3654 (1988)]等が報告されているが、 イヌ免疫グロブリンA鎖に関する報告はまだない。

本発明者は、 イヌ肝臓細胞の染色体DNAから、 ヒト免疫グロブリン遺伝子をアロープとして用い、

#### 特開平4-40894(4)

イヌ免疫グロブリン定常領域をコードすると思われる遺伝子断片を得ることに成功した。クローニングされた遺伝子断片の塩基配列から予測されるアミノ酸配列と、他の動物種の免疫グロブリンのC領域遺伝子の配列とを比較し遺伝子解析を行った結果、本発明により得られた遺伝子断片は、 $\alpha$ 鎖に関する免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子断片であることが判明した。

得られたイヌ免疫グロブリンA固定常領域をコードするDNA断片の塩基配列を解析し、固定常領域のアミノ酸配列を見いだし、これをこれまでに報告されているヒト、マウス、ウサギ等の免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列と比較検討したところ、イヌ免疫グロブリンA固定常領域に特異的なアミノ酸配列として、 $\alpha$ 鎖固定常領域のCB3ドメインのC末端側から最初のシスティンの近傍のアミノ酸配列が下記(A)のアミノ酸配列であることが見いだされた。

(A) -Ile-Cys-Ala-

本発明者は、本発明により解析されたイヌの

免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列、およびこれまでに解説されている個々の動物の免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列を比較することにより、上記のシスティンの近傍に存在する-Ile-Cys-Ala-の領域は、イヌ、マウス、ヒト等の種の違いによっていずれも異なるアミノ酸配列となっている領域であることを見いたした。また、同時にこの領域は、例えばヒトの $\alpha$ 鎖固定常領域のアミノ酸配列としては、サブクラス間で極めてよく保存されていることも見いたし、今回本発明により明らかにされた上記の配列は、イヌ免疫グロブリンA固定常領域特有の配列であると確認された。

また、CB3ドメインのN末端側から3番目のアミノ酸から始まる配列にも、同様なイヌ免疫グロブリンA固定常領域特有の下記(B)の配列を見いたした。

(B)-Ala-His-Gly-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

周、本発明においてクローニングされたこの遺

域のアミノ酸配列は下記の通りであり、このアミノ酸配列(B)がイヌ免疫グロブリンA固定常領域に存在する特有のアミノ酸配列の特徴的ーー門として挙げられる。

(B)'-Ala-His-Gly-Pro-Ser-

本発明のイヌ免疫グロブリンA固定常領域をコードする遺伝子断片においても、上記(A)および(B)のアミノ酸配列をコードするDNA配列をその一部に含むことを特徴とする。このような上記の $\alpha$ 鎖に含まれるアミノ酸配列は、イヌ免疫グロブリンA鎖のC領域を決定する重要なアミノ酸配列を含み、本発明により初めて明らかにされた。

これらのアミノ酸配列を含んだイヌ免疫グロブリンA固定常の特徴的ーー門を示すと、下記に示すアミノ酸配列が挙げられる。

Ser-Thr-Thr-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Asp-Pro-Ser-Cys-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Ser-Thr-Val-Ala-Leu-Ala-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Try-Asn-Ser-Gly-Ser-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ser-Asp-Leu-Gly-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Net-Val-Thr-Val

Pro-Ser-Ser-Arg-Trp-Ser-Ser-Glu-Thr-Phe-Thr-Cys-Asn-Val-Ala-His-Pro-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Pro-Val-Pro-Lys-Arg-Gly-Asn-Gly-Arg-Val-Pro-Arg-Pro-Pro-Asp-Cys-Pro-Lys-Cys-Pro-Ala-Pro-Gly-Net-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Gly-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Leu-Gly-Pro-Gly-Asp-Pro-Gly-Val-Gly-Ile-Ser-Trp-Phe-Val-Asp-Gly-Lys-Gly-Net-Gly-Thr-Ala-Lys-Thr-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-Gly-Phe-Asn-Gly-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Lys-Phe-Ile-Gly-Bis-Gly-Asp-Trp-Leu-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe-Thr-Cys-Lys-Val-Asn-Asp-Lys-Ala-Leu-Pro-Ser-Pro-Ile-Gly-Gly-Thr-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser-Lys-Tyr-Arg-Thr-Thr-Pro-Pro-Gly-Leu-Asp-Gly-Asp-Gly-Ser-Thr-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Ser-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Phe-Ile-Cys-Ala-Val-Net-His-Gly-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gly-Lys-Ser-Leu-Ser-His-Ser-Pro-Gly-Lys

このようなアミノ酸配列もしくはこれをコード

特開平4-40894(5)

する核酸塩配列については一切その範囲内はなく、本発明により初めて開示されるものである。

また、本発明のイヌ免疫グロブリンア酸のC領域をコードする遺伝子の具体的核酸塩配列の一例としては、第5図に示された塩基配列が挙げられる。

また、本発明のγ重連伝子を用いてイヌ黒色体DNAとサインハイブリダイゼーションを行った結果、本発明のα酸以外に、同ヒイヌα酸に属している他のサブクラスのC領域遺伝子がいくつか存在していることが示された。ヒトとマウスの例【例えば、猪水ら、Cell, 29, p121 (1982); 高橋ら、Cell, 29, p671 (1982)】からも、イヌα酸にもいくつかのサブクラスが存在すると思われる。また、イヌα酸には直接的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており【John S. Johnsonら、J. Insectol., 48, p923 (1966)】。本発明の遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。従って、本発明の遺伝子を用いて残りのサブクラスのC領域遺伝子をクローニングすることが可能であると思われる。

尚、同一のサブクラス内においても1ヶ所から数ヶ所のアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子が存在することがヒト、ウサギ等の免疫グロブリンア酸の遺伝子解析の結果から予想される。本発明のイヌ免疫グロブリンα酸定塩配列をコードする遺伝子断片は、上記のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片のみに限られず、このような部分的にアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子をも包含する。

キメラ抗体の作製方法はすでにマウス-ヒトキメラ抗体で示された方法【高辻ら、Cancer Research, 47, p999-1005 (1987)】に準じて行うことができる。すなわち、キメラ抗体遺伝子は、基本的にV領域遺伝子とC領域遺伝子の2種類の遺伝子断片を組合せることにより構成される。さらに、遺伝子の構成に応じて、主として2つの組合せがある。すなわち、黒色体DNAから導出したVとC領域遺伝子、cDNAから導出したVとC領域遺伝子の組合せである。

例えば、マウス黒色体DNAから導出したV領域遺伝子を、イヌ黒色体DNAから導出したC領域遺伝子

と組合させた場合、マウスV領域遺伝子には発現に必要なアロモーター・エンハンサー等の発現調節領域を含んでいることが好ましい。ただし、アロモーター・エンハンサー等はマウス由来である必要はなく、イヌ由来でもヒト由来でもウイルス由来でも差しつかえない。また、アロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが好ましいが、エンハンサーについては必ずしもこの位置に規定されるものではない。一方、マウスcDNAから導出したV領域遺伝子を、イヌcDNAから導出したC領域遺伝子と組合させる場合、その組合部分は適当な制限酵素サイトや、必要であれば適当な合成リンカーや用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないよう、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化しないよう組合しなければならない。さらに、宿主細胞内で発現を可能にするための適当なアロモーター・エンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してや

る必要がある。このようにして作製したキメラ抗体遺伝子を、例えば、pSV2-gpt【R. C. Hollingshead, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, p2027 (1981)】、pSV2-neo【P. J. Southernら、J. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)】等の選択マーカーの付いた適当なベクタープラスミドに、あるいは、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス遺伝子の一部(バビローフウイルスなど)を持ったベクタープラスミドに、I型遺伝子とL型遺伝子を別々に、あるいは同時に組み込み、キメラ抗体遺伝子プラスミドを複数することが望ましい。マウス-イヌキメラ抗体を得るためにには、このようにして調製されたキメラ抗体遺伝子を含むプラスミドを用いて宿主動物細胞を用意化することが必要である。宿主動物細胞としては、不規化されたマウス及び他の動物細胞、詳しくは3リンパ系細胞【例えば、P3X63AG8-653 (ATCC CRL 1580), P3X63AG8-1 (ATCC CRL 1597), P3/BS1/1 AG4-1 (ATCC CRL18)、Sp2/0-Ag12 (ATCC CRL 1581)等の懸濁細胞、ハイブリドーマ】である。cDNAによる

細胞の形質転換方法としては、DNA-デキストララン法、細胞カルシウム共沈法、アロトアロスト融合法、エレクトロポレーション法等の方法【例えば、B. D. Barnesら編纂 "Transcription and Translation" IBL Press (1984) 参照】があり、いずれの方法でしょい、細胞とL細胞のキメラ抗体遺伝子を同時に持つプラスミドで形質転換を行う場合には選択マーカーは1種類でよいが、細胞L細胞等の場合には2種類のマーカーが必要である。この場合には、1つのプラスミドで形質転換を行った後に、さらにもう一方のプラスミドで形質転換を行う二重形質転換法を用いるのが好ましい。このようにして形質転換された細胞を通常のハイブリドーマと同じ条件で増殖する(例えば、10%牛胎児血清を含む RPMI 1640培地)で培養すれば、この細胞から通常のハイブリドーマの產生する抗体と同時にマウス-イヌキメラ抗体が分離產生される。このキメラ抗体は通常の抗体と同様な方法により精製することが出来る。

本発明により提供されるイス免疫グロブリンを

コードする遺伝子断片は、イス免疫グロブリンA鎖のC領域の特異的アミノ酸配列もしくはDE94配列を表示するものであり、この遺伝子を用いて、上述のようにして得られるマウス-イヌキメラ抗体は、イスの疾患に対して、これまでになかった実質的に有効なお薬、予防及び治療剤となりうるものである。

次に、その実施例を示すが本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例

##### (1) イヌ免疫遺伝子の風築

イス免疫遺伝子をクロスハイブリダイゼーション法によりクローニングするために、まずヒトA鎖【工藤ら、Gene, 33, p181 (1989), 西村ら、Cancer Res., 47, p999 (1987)】とのクロスハイブリダイゼーションの条件を検討した。コンピュータを用いてマウス、ヒト、ウサギA鎖間でホモロジー解析をした結果、特にCB2-CB3エクソンを含む領域が非常にホモロジーが高いことが示された。更って、このヒトC<sub>y</sub>遺伝子よりCB2-CB3エクソン

を含むDE94-1-SmaI断片を切り出し、アロープとして使用した。

イス肝臓の染色体DNA100mgをS160Tで部分消化(100units, 37°C, 10分)した後、この18~20kbpに相当するDNA断片をしょ錠密度勾配濃心(しょ錠10~40%, 1st vol), 26000rpm, 18時間, 15°C)により調節した。次にこのDNA断片と人EMBL3ベクターDNA(ストラタジーン社製)のBamHIの断片とをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、P293大鼠腫瘍(ストラタジーン)に感染させ、イス肝臓細胞のア膜遺伝子ライブラリを得た。このライブラリから、ヒトC<sub>y</sub>アロープを用いてブラークハイブリダイゼーション(B. D. Beeton, B. D. Davis, Science, 196, p180 (1977))を行い、イスC<sub>y</sub>遺伝子を含むクローンDE94を収集した。このクローンのサイズは約20kbで、その側面断面の断点地図を第1図に示す。このクローンから、イスC<sub>y</sub>遺伝子を含むBamHI-BamHI断片DE94-2(2kb)を分取し後の実験に用いた

##### (2) DE94-2を用いたサインプロット分析

初めてこのDE94-2を用いたサインプロット分析を行った。イス肝臓細胞の染色体DE94-2を側面断面BamHIで切断し、このDE94-2を電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ハイボンド-Eアラス、アマシーム社製)に貼り下す。イスC<sub>y</sub>遺伝子を含んだ[<sup>32</sup>P]標識DE94-2アロープとサインハイブリダイゼーションを行った。サインハイブリダイゼーションの方法はハイボンド-Eアラスに付属していたマニュアルのアロトコールに従った。検出されたバンドのパターンを、ヒトC<sub>y</sub>遺伝子アロープを用いたクロスハイブリダイゼーションのパターンと比較した結果、全く同じ位置(2kb)にバンドがみとめられた(第2図)。分子サイズは人ファージDNAをBamHIで切断したマークercDNAによって算出した。また、2kb以外に1.9, 1.2, 1.0kbpにもDE94-2とハイブリダイズするバンドを検出した。この結果より、このDE94-2以外に同一イス細胞に残している他のアブクラスのC<sub>y</sub>遺伝子

遺伝子がいくつか存在していることが示された。イヌア属には血清学的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており [John S. Johnsonら, J. Immunol., 98, p923(1966)]。DE94ア遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。

次にノーダンプロット分析を行った。イヌ脾臓ポリA+RNA(クローンテック社製)2μgを電気泳動により3%ボルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに調査し、ナイロンメンブレンフィルター(ハイボンド-3アラス)に転写後、[<sup>32</sup>P]標識DE94アプローブとノーダンハイブリダイゼーションを行った。ノーダンハイブリダイゼーションの方法はハイボンド-3アラスに付属のマニュアルのアロトコールを使った。このプローブにより約1.8kbの位置にバンドが検出された(第3図)。このサイズはマウス及びヒトで知られている免疫グロブリンア属遺伝子のサイズとはほぼ同じである。

これら2つの結果より、DE94アは機能的なイヌC<sub>y</sub>領域を含む活性な遺伝子であることが推定され

た。尚、このDE94アが組み込まれたプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DCG-DE94G〔特許出願書類第11466号〕として出願人により登録されている。

#### (3) DE94アの核酸塩基配列とアミノ酸配列

イヌC<sub>y</sub>領域の核酸塩基配列を調べるために、クローンDE94アから、BamHI-EcoRI, EcoRI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-BamHIの各小DNA断片を調査した。これらの各小断片をT4-DNAオリメラースを用いて切断面を平滑末端に変えた後、XH13np19ベクターのSmaIサイトに宝ライゲーションキットを用いて挿入した。東洋紡インストラクトマニュアルの方法を使い、JM109のコンピテント細胞を調査し、C<sub>y</sub>領域遺伝子を挿入したXH13np19 DNAで形質転換させ、一本鎖DNAを抽出培養した。さらにこの一本鎖DNAの核酸塩基配列決定は、Seq sequencer ver.2.0 DNAシーケンスキット(United States Biochemical Corporation)を用いて行った。核酸塩基配列を行った方向は第4図に示す。核酸塩基配列決定の結果、CH1-ヒンジ-CH2-CH3からな

るイヌア遺伝子が確認された。第5図にその結果を示す。さらに、この核酸塩基配列を基に予想されるアミノ酸に実施した(第6図)。

このDE94アの核酸配列を基に遺伝子解析ソフト(Genetyx:ソフトウェア開発社製)を用いて、LASLデータベースをホモロジー検索したところ、ヒト及びマウスの免疫グロブリンア属と高いホモロジーを示し、免疫グロブリンア属遺伝子以外の遺伝子とはホモロジーは示さなかった。DE94ア遺伝子のC<sub>y</sub>領域とマウス及びヒトのC<sub>y</sub>領域をホモロジー比較すると、アミノ酸レベルでマウスア1とは61.0%, ヒトG1とは70.4%であった。

以上の結果より、DE94ア遺伝子は間違いなくイヌア属に属する遺伝子であり、マウス-イヌキメラ抗体の作用を可能にする遺伝子であると思われた。

#### (4) マウス免疫グロブリンア属遺伝子(V<sub>H</sub>)領域遺伝子の単離

既CPY抗体産生ハイブリドーマJP2(ケ1.4)より染色体DNAを単離し、染色体DNA100μgを制

度酶第HinfIで切断する。次にこのDNA断片とXH14ベクター-DNA(ストラクション)をT4 DNAリガーゼにより連結させ、JP2細胞の染色体DNAライプラリイを得た。このライプラリイから、アラートハイブリダイゼーション法[W. D. Beat et al., E. B. Davis, Science, 196, (p180 (1977))参照]によりマウスJHプローブを用いて既CPY抗体のV<sub>H</sub>領域遺伝子を含むクローンJP2gH211を選択した。第7図はその制限酵素切削点地図である。この遺伝子断片よりV<sub>H</sub>エクソン部分を含んだEcoRI-SacI断片を調査し、以下のイヌ-マウスキメラ抗体H鎖遺伝子の材料とした。尚、この既イヌバルボウイルス活性を有するマウス免疫グロブリンH鎖のV<sub>H</sub>領域遺伝子が組み込まれたプラスミドを有する大腸菌が、Escherichia coli NY8-JP2〔特許出願書類第11167号〕として出願人により登録されている。尚、同じJP2細胞から、マウスJHプローブを用いてクローニングした既イヌバルボウイルスマウス免疫グロブリンH鎖のV<sub>H</sub>領域遺伝子は、Escherichia coli NY8-JP2〔特許出願書類第11167号〕として出願人により登録されている。

第11165号]として出願人により著述されている。  
(5)マウス-イヌキメラ抗H肝臓抗体(pSV2-PBDC-C $\gamma$ )の作製

(1)で得られたプラスミドpDE94 $\gamma$ をBamHIで切削し、イヌ免疫グロブリンC $\gamma$ 遺伝子を含む211のBamHI断片を調製した。この遺伝子をBamHIで切削したpSV2-gptベクターとともに主ライゲーションキットを用いて連結し、プラスミドpSV2-DC $\gamma$ を得た。次に、(4)で得られたpJP2gE211のEcoRI-SacI断片の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に定め、主ライゲーションキットを用いて前述のプラスミドpSV2-DC $\gamma$ のBpaIサイトに挿入しプラスミドpSV2-PBDC $\gamma$ を作製した。(第8図)

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明においてクローニングされたイヌ免疫グロブリンC $\gamma$ 遺伝常領域をコードする染色体DNA断片(DNaDE9 $\alpha$ 及びDE94 $\gamma$ )の制限酵素切削地図を示す。

第2図は、イヌ肝臓細胞の染色体DNAを制限酵素BamHIで切削し、これをイヌC $\gamma$ 遺伝域を含んだ(

7)の精製図を示す。

特許出願人 財團法人 化学及生物学研究所  
 代理人弁理士 関井加

[ $^{32}P$ ]標識DE94 $\gamma$ (1)及び[ $^{32}P$ ]標識ヒトC $\gamma$ 1鎖(2)プローブとサインハイブリダイゼーションを行った結果の模式図である。

第3図は、イヌ肝臓ポリA+ RNAと[ $^{32}P$ ]標識DE94 $\gamma$ プローブとのノーザンハイブリダイゼーションの模式図である。

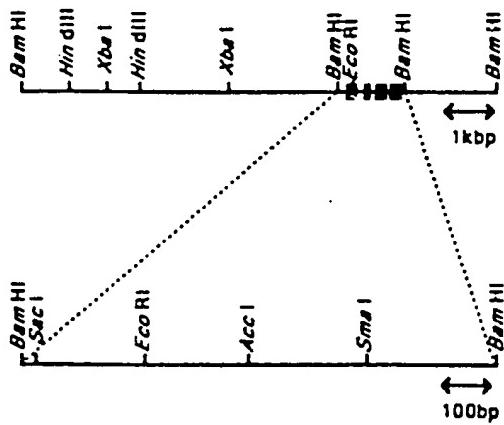
第4図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ の制限酵素切削地図および塩基配列解析を行った領域(-)を示す。

第5図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ に存在するイヌ免疫グロブリンC $\gamma$ 遺伝常領域をコードするDNA塩基配列を示す。

第6図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ 中にコードされるイヌ免疫グロブリンC $\gamma$ 遺伝常領域の全アミノ酸配列を示す。

第7図は、実施例(5)で調製した抗CPV抗体のVH領域遺伝子を含むクローリーJP2gE211の制限酵素切削点地図を示す。

第8図は、実施例(6)で調製した抗CPVマウス×イヌキメラ抗体H鎖を発現する遺伝子(pSV2-PBDC



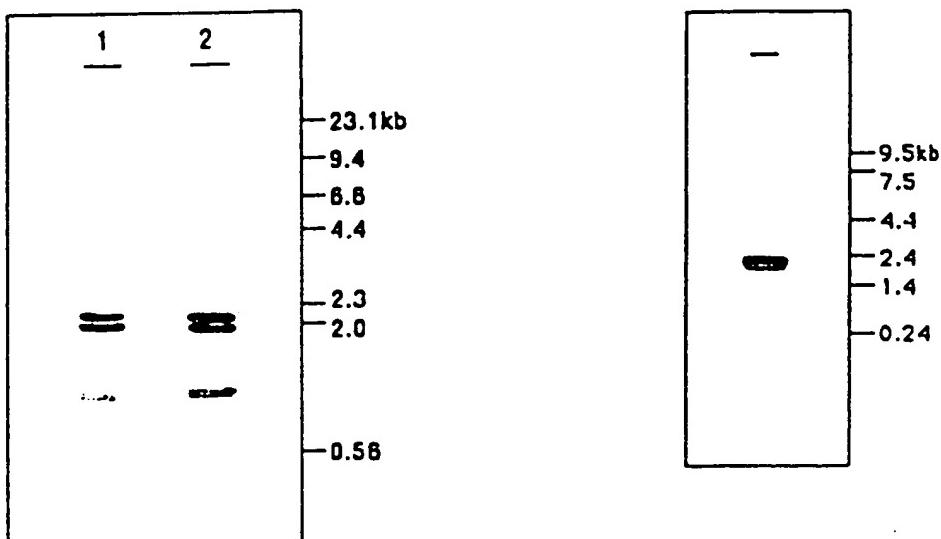


図 3

図 2



図 4

図 5

CCTCCACCAAC GGGCCCCCTCG TTTTTCACAC TGGACCCCAAG CTGGGGGTCC  
 ACTTCCGGCT CCACGGTGGC CCTGGCTGCG CTGGTGTCAG CCTACTTCC  
 CGAGCCCTGTA ACTGTGTCTT GGAATTCGGG CTCFTTGACCC AGGGGTGTG  
 ACACCTTCCC GTCCGACCTG CAGTCCTCTAG GGCTCTAFTC CCTCAGGAGC  
 ATGGTGACAG TCCCTCTCCAG CAGGTGGTCC AGCGAGACCT TCACCTGAA  
 CCTGGGCCAAC CGGGCCAGGA AAACATAAAGT AGACAAGCCA GTGGCCAAAAA  
 GAGAAAATGG AAGAGTTCTT CGCCCACTG ATTGTCCCCA ATGCCCACTC  
 CCTGAAATGC TGGGAGGGCC TTCCGCTTTC ATCTTCCCCC CGAAACCCAA  
 GGACACCTCTC TTGATTGCCG GAACACCTGA GGTCACTATGT GTGGTGGTGG  
 ATCTGGGACC AGAAGACCTT GAGGTGCAAGA TCAGCTGGTT CGTGGACGGT  
 AAGCAGATG AAACACCCAA GACTCAACCT CGTGAGGAGC ATTCATG  
 CACCTACCT GTGGTCAGTG TCCCTCCCAT TGGGACCCAG GACTGGCTCA  
 AGGGGAAGCA GTTCATGTC AAAGTCACAA ACAAAACCCCT CCCATCCCG  
 ATCGAGAGGA CCATETCCAA CGCCAGAGGG CAGGGCCCATC AGCCCACGT  
 GTATGTCTG CGGGCATCCC GGGAGGAGTT GAGCAAGAAAT AGATGCACT  
 TGACATGCC T GATCAAAGAC TTCTTCCAC CTGACATTGA TGTGGAGTGT  
 TGGAGCAATG GAGAGCAAGA GCTTGAGAGT AAGTACCGCA CGACCCCCGGC  
 CCAGCTGGAC GAGGACGGGT CCTACTTCTCT GTACAGCAAG CTCTCTGTG  
 ACAAGAGGGG CTGGCACCCG GAGACACCT TCATATGTGC GGTGATGCCAT  
 GAGGCTCTAC ACAACCACTA CACACAGAAA TCCCTCTCCC ATTCTCCGGG  
 TAAATGA

図6

Der Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Asp Pro Ser Cys  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val  
 Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asp Ser  
 Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser Asp Leu  
 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val  
 Pro Ser Ser Arg Trp Ser Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val  
 Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro  
 Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro  
 Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Glu Pro Glu  
 Asp Pro Glu Val Glu Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu  
 Met Glu Thr Ala Lys Thr Glu Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn  
 Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Glu  
 Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Thr Cys Lys Val Asn Asp  
 Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala  
 Arg Glu Glu Ala His Glu Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro  
 Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys  
 Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp  
 Glu Ser Asn Glu Glu Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr  
 Thr Pro Pro Glu Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr  
 Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Arg Gly Asp  
 Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Glu Lys \*\*\*

図7

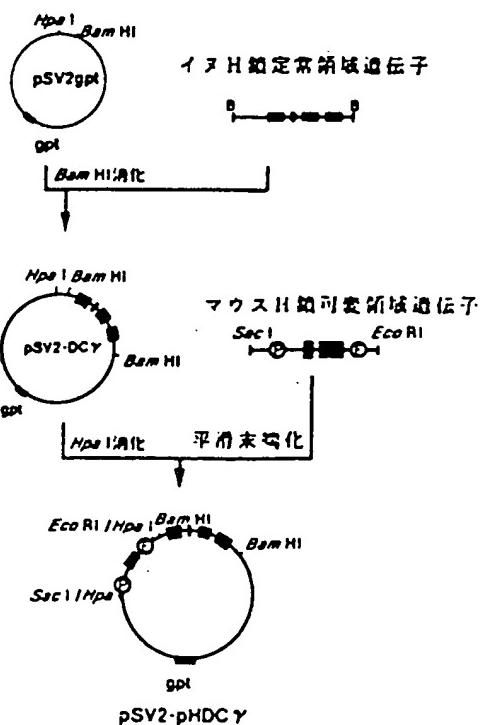
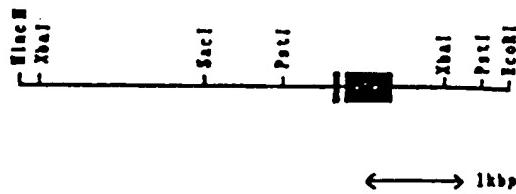


図8

第1頁の続き

◎Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号
C 12 N 15/62		
C 12 P 21/08		
# A 61 K 39/395	A F E H	8214-4B
G 01 N 33/531		8829-4C
33/577	A	7906-2J
	B	9015-2J